

BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND



Bescheinigung



Die Herren Professor Dr. Albrecht W e n d e l in
Tübingen/Deutschland und Dr. rer. nat. Dr. med. Thomas
H a r t u n g in Konstanz/Deutschland haben eine
Patentanmeldung unter der Bezeichnung

"Untersuchungsverfahren mit biologischem
System"

am 23. Dezember 1996 beim Deutschen Patentamt einge-
reicht.

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue
Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patent-
anmeldung.

Die Anmeldung hat im Deutschen Patentamt vorläufig das Symbol
G 01 N 33/49 der Internationalen Patentklassifikation erhal-
ten.

München, den 22. Dezember 1997
Der Präsident des Deutschen Patentamts
Im Auftrag

Joost

Patenzahlen: 196 54 266.9



Dr. WILHELM J. BERG
PATENTANWALT
MAUERKIRCHERSTRASSE 45 · 81679 MÜNCHEN

~~Belegexemplar~~
~~Darf nicht geändert werden~~



Case: DB/lei

23.12.1996

Prof.Dr. Albrecht Wendel

Im Buckenloh 19

D-72070 Tübingen

Dr.rer.nat.Dr.med. Thomas Hartung

Glärnischstraße 17

D-78464 Konstanz

Untersuchungsverfahren mit biologischem System

Zusammenfassung

Untersuchungsverfahren mit biologischem System

- 1 Tiefgefrorenes Blut enthaltende Zubereitungen werden für Untersuchungsverfahren für Blut-Antwort-Bestimmungen verwendet.

5

10

15

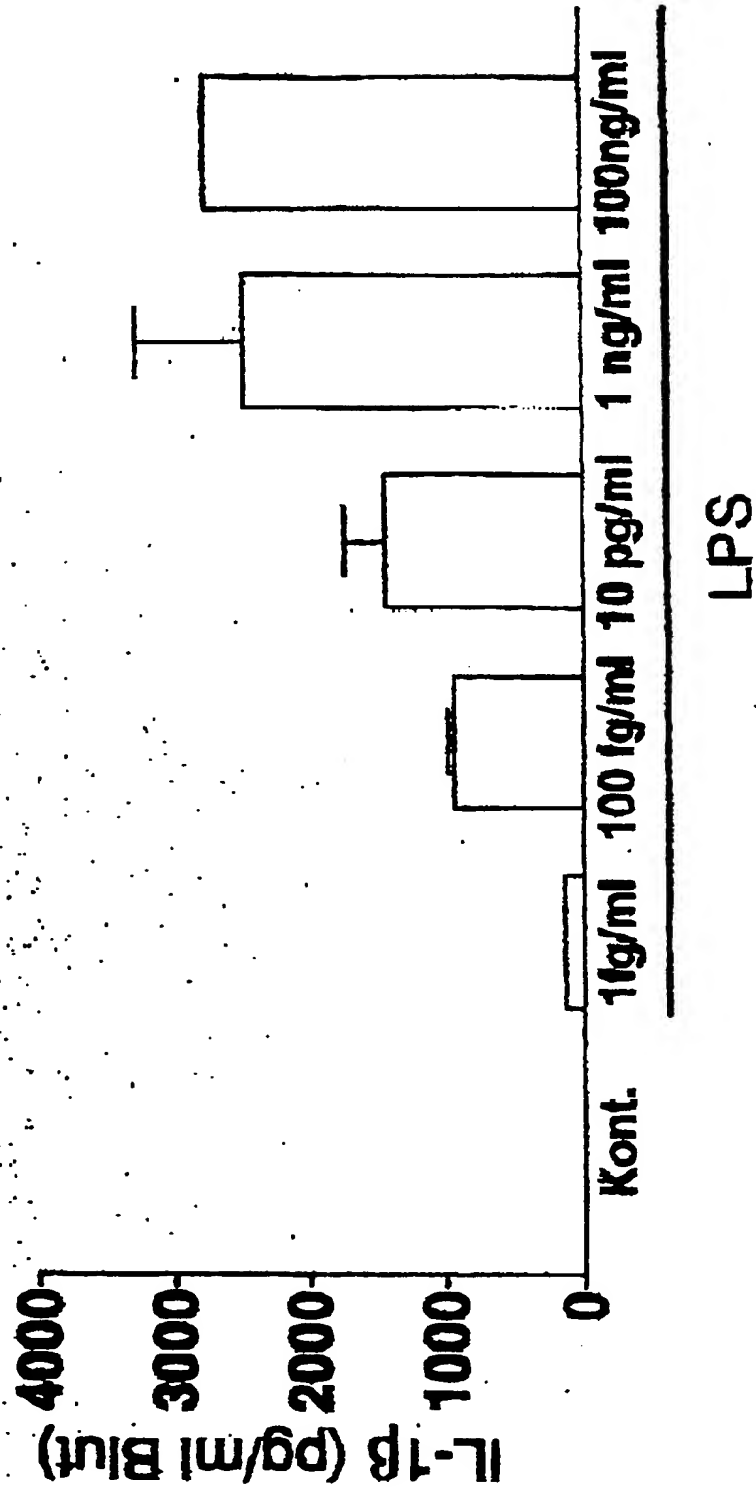
20

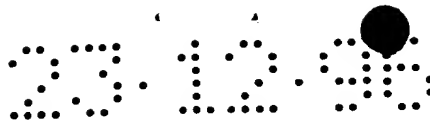
25

Figur für die Zusammenfassung

IL-1 β Freisetzung von mit LPS stimuliertem eingefrorenem 10% Vollblut

Fig. 1





5

Beschreibung

- 1 Die Erfindung liegt auf dem Gebiet der Verwendung biologischer Systeme für Untersuchungen. Biologische Systeme werden seit langem in erheblichem Umfang für Untersuchungen verwendet, wobei die Prüfmaterialien, d.h. die zu prüfenden Gegenstände, Stoffe oder Mittel mit dem biologischen System in Kontakt gebracht werden und dann die Antwort des Systems, wozu auch eine Nicht-Antwort gehört, qualitativ und/oder quantitativ erfaßt und gewertet wird. Ganz üblich sind derartige Verfahren in der Dermatologie, wo zur Durchführung eines solchen biologischen Untersuchungsverfahrens als biologisches System die Haut von Probanden oder
- 5
- 10 Hautpräparate verwendet werden und im Kontakt mit einem Prüfmaterial die Antwort der Haut bzw. des Hautpräparates bestimmt wird. Bebrütete Hühnereier werden zur Prüfung auf Schleimhautirritationen, Schlachthofmaterialien aller Art als biologisches System für unterschiedlichste Prüfungen verwendet.
- 15
- Die vorliegende Erfindung betrifft den speziellen Bereich der Verwendung von Blut als biologischem Untersuchungssystem. Beispielsweise ist es bekannt, daß viele Materialien bei Kontakt mit menschlichem Gewebe, Körperflüssigkeiten und Zellen das Immunsystem aktivieren oder in schädlicher Form überaktivieren können, teils weil sie an sich immunstimulatorisch sind, teils weil sie immunstimulatorische Anteile wie fiebererzeugende Pyrogene enthalten. Zu den Materialien mit einem solchen Gefahrenpotential gehören insbesondere Medikamente, vor allem inhalierbare, injizierbare und infundierbare Produkte, einschließlich Blutersatz- und Blut-
- 20
- 25 austausch-Materialien, Kunststoffe unterschiedlicher Aggregatzustände, Formen und Bestimmungen, einschließlich Dispersionen und Werkstoffen wie Membranen und Prothesen, sowie Naturstoffisolierungen, einschließlich aus Pflanzen, Tier und Mensch oder deren Zell- und Gewebekulturen, isolieren Produkten wie Impfstoffen, Medikamenten und Gentherapeutika. Materialien, die im Kontakt mit menschlichem Gewebe, Zellen oder Körperflüssigkeiten eine Freisetzung von Faktoren aus den Leukozyten wie Zytokinen des Organismus bewirken, werden als Immunaktivatoren bezeichnet, im engeren Sinne als Pyrogene, wenn die freigesetzten Faktoren eine Fieberreaktion im Organismus vermitteln können. Die Pro-
- 30



- 1 duktsicherheit z.B. im Pharmabereich ist ein dringendes Bedürfnis und
macht daher, um auch ausnahmsweise kontaminierte Chargen zu erken-
nen, ständige Einzelprüfungen an Versuchstieren erforderlich. Statt des
Pyrogentests am Kaninchen wie er in den verschiedenen Pharmakopoen
5 vorgeschrieben wird oder des Limulus-Amöbozyten-Lysat-Tests (LAL), der
jedoch nur einen Teil der Pyrogene/Immunaktivatoren, nämlich die Endo-
toxine Gram-negativer Bakterien detektiert, haben die gleichen Erfinder
deshalb bereits früher ein Verfahren beschrieben (Europäisches Patent O
741 294 A2 und Hartung und Wendel, ALTEX 12, S 70-75, 1995), bei dem
10 einfach, kostengünstig und mit großer Bandbreite Blut oder Blutaufberei-
tungen als biologisches System mit dem zu prüfenden Material in Kontakt
gebracht und die Freisetzung von Zytokinen z.B. Leukozytenfaktoren wie
Interleukin-1 (IL-1 β), die im Organismus die Fieberbildung vermitteln
(endogene Pyrogene) gemessen wird. Nicht selten wird hierbei aber auch
15 ganz allgemein in Fällen, wo Vollblut als biologisches System für die Un-
tersuchung benötigt wird, die Blut-Antwort baldigst benötigt, so daß die
Untersuchung mit dem Prüfmaterial ohne Verzögerung, jedenfalls inner-
halb weniger Stunden eingeleitet werden muß. Für ein Austesten der Re-
aktionsfähigkeit des dabei verwendeten frischen Vollbluts verbleibt damit
20 keine Zeit, so daß eine Verfälschung mit gefährlichen Konsequenzen bzw.
die Unbrauchbarkeit der Ergebnisse als Folge eines Bluts eines menschl-
ichen Blutspenders mit abnormen Reaktionen z.B. aufgrund genetischer
Variationen, Erkrankungen oder Lebensgewohnheiten, nicht mit der not-
wendigen Sicherheit ausgeschlossen werden kann. Wie bei dem beispiel-
25 haft vorerwähnten Fall der Prüfung pharmazeutischer Produktionschar-
gen ist, bei der Gefahr unsachgemäßen Transports oder Lagerung, oft eine
Prüfung vor dem Einsatz des Materials erforderlich, wobei bei der Verwen-
dung von Blut als biologischem System aus vorgenannten Gründen ein
Vergleich mit früheren Testergebnissen nicht mit ausreichender Verläß-
30 lichkeit möglich ist.

Eine der Aufgaben der Erfindung besteht demgemäß darin, bei der Ver-
wendung von Blut als biologischem System für Untersuchungen einen re-
produktionssicheren, störungsfreien Ablauf zu sichern, die Möglichkeit

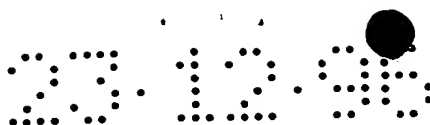


- 1 von Verfälschungen aufgrund abnormer Reaktionen auszuschließen und
einen Weg aufzuzeigen, der die Vergleichbarkeit von Untersuchungser-
gebnissen mit dem gleichen Prüfmaterial zuläßt. Es soll die wiederholte
Prüfung standardisiert an verschiedenen Orten und zu verschiedenen Zei-
5 ten ermöglicht werden. Weitere Aufgaben ergeben sich aus den weiterhin
geltend gemachten Vorteilen.

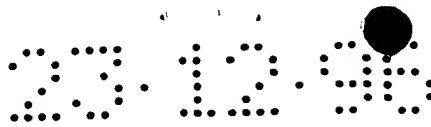
- Die Lösung der gestellten Aufgabe gelingt durch die Verwendung von tief-
gefrorenem Blut oder von tiefgefrorenem Blut enthaltender Zubereitung
10 für biologische Untersuchungsverfahren zur oder mit Bestimmung der
Blut-Antwort auf Kontakt mit Prüfmaterial.

- Die Verwendung tiefgefrorenen Bluts bzw. einer ein solches Blut enthal-
tenden Zubereitung ermöglicht die jederzeitige Verfügungsbereitschaft ei-
15 nes zuvor ausgetesteten und damit von abnormen Reaktionen freien Bluts
als biologischem System, zumindest aber eine Standardisierbarkeit und
damit die Verwendung eines standardisierten Reagenzes. Nachdem von ei-
ner Blutcharge regelmäßig eine Vielzahl voll identischer, tiefgefrorener
Einheiten herstellbar ist, kann damit der Forderung nach Reproduzier-
20 barkeit der Untersuchungen zu verschiedenen Zeiten an verschiedenen
Orten Genüge getan werden, abgesehen davon, daß darüberhinaus eine
Charakterisierung einer solchen Charge mit untersuchungsrelevanten
Daten auch Wege für Vergleiche mit Untersuchungsergebnissen bei Ver-
wendung einer anderen, ebenfalls ausreichend charakterisierten Blut-
25 charge eröffnet.

- Für das tiefgefrorene Blut hat sich tierisches oder menschliches Vollblut
ohne Trennung von Einzelkomponenten, besonders frisch gewonnenes
Blut gesunder menschlicher Spender bewährt. Die einzelnen Bestandteile
30 einschließlich Leukozyten liegen so in ihrer natürlichen Umgebung vor,
einschließlich aller Serumkomponenten, die auf die Wirkung des Prüfma-
terials möglicherweise Einfluß haben. Die Verwendung tiefgefrorenem
Vollbluts ist deshalb weit bevorzugt, wenn auch die Verwendung von aus
Blut isolierten Leukozyten nicht ausgeschlossen ist. Die meisten Isolie-



- 1 rungsmethoden sind jedoch für eine Routinetestung sehr aufwendig, so
daß die Verwendung von Vollblut einfacher und für die gewünschte Aussage
sicherer und wegen der interaktiven Einflußmöglichkeit der weiteren
Blutbestandteile aussagekräftiger ist.
- 5
- In jedem Fall ist zur Durchführung des biologischen Untersuchungsver-
fahrens das tiefgefrorene Produkt aufzutauen. Das Prüfmateri-
al wird mit dem Blut bzw. dessen Zubereitungen solange und in solcher Weise in Kon-
takt gebracht, wie dies für die Erzielung einer ausreichenden Blut-Antwort
10 erforderlich ist, Kontaktzeiten von einigen Sekunden oder Minuten kön-
nen ausreichend sein, ohne daß mehrstündige Kontaktzeiten ausge-
schlossen wären. Jede der zur Erreichung des vorgenannten Zwecks ge-
eignete Kontaktform kann angewendet werden, z.B. bei Gegenständen das
Eintauchen, Durchspülen, Ablaufenlassen, bei Lösungen, Dispersionen,
15 Kulturen und Feststoffen das Vermischen mit oder Zusetzen von oder zu
dem Blut bzw. den Blutzubereitungen und dergleichen zur Ermittlung der
Blut-Antwort, regelmäßig nach auch kurzzeitiger Inkubation des Bluts
bzw. der Blutzubereitung nach dem Kontakt mit dem Prüfmateri-
al, kön-
20 nen die üblichen biologischen, physikalischen, chemischen und/oder
physikalisch-chemischen Bestimmungs- und Meßmethoden verwendet
werden. Hierzu gehören biologische Assays- und RIA-Verfahren, bevor-
zugt spektrometrische Verfahren, alle Verfahren, die der qualitativen und
quantitativen Stoffmessung freigesetzten oder gebildeten Stoffe die neu
wie ELISA witer Verfahren der Turbidimetrie, Chemolumineszenz usw.
- 25
- Die Zubereitungen mit tiefgefrorenem Blut oder auch Leukozyten können
Verdünnungsmittel, gerinnungsverzögernde Bestandteile, Kryopräservie-
rungsmittel und andere ansich bekannte sofern das Untersuchungsergeb-
nis nicht beeinflussende Zusätze enthalten. Als Verdünnungsmittel ha-
30 ben sich isotonische Lösungen wie isotonische Kochsalzlösung, Rin-
ger'sche Lösung und Zellkulturmedien wie RMPI 1640 bewährt. Es ist von
Vorteil, die Verdünnungsmittel erst zur Testdurchführung während oder
nach dem Auftauen z.B. bei 37°C zuzusetzen. Die Verdünnungsmittel kön-
nen beispielsweise in Mengen von 5 - 95 Vol.-% in der Gesamtzubereitung



- 1 enthalten sein. Häufig wird eine Verdünnung 1 zu 10 Vol.-Teilen Verdünnung benutzt.

- Zur Herstellung des tiefgefrorenen Bluts-Reagens kann das Blut oder die
- 5 Blutzubereitung mit Kryopräservierungsmitteln versetzt, gegebenenfalls geeignet portioniert und dann tiefgefroren werden. Als solche Kryopräservierungslösungen eignen sich organische Lösungen, anorganische, auch salzhaltige Lösungen oder deren Mischungen in variablen Anteilen. So hat sich zum Beispiel die Verwendung von 10 % Dimethylsulfoxid allein oder
- 10 von Glycol bzw. Glycerin allein oder in Mischungen untereinander oder mit Dimethylsulfoxid als besonders geeignet erwiesen. Vorteilhaft ist ein gesteuertes langsames Einfrieren zum Beispiel mit -1°C pro Minute. Bewährt hat sich eine Lagertemperatur des gefrorenen Blutes bei -70°C im Tiefkühlschrank, oder auch der Einsatz kondensierter oder fester Gase
- 15 wie flüssiger Stickstoff oder Trockeneis. Letzteres eignet sich besonders zum Transport.

- Gerinnungsverzögernde Bestandteile können sowohl in der tiefgefrorenen Zubereitung enthalten sein als auch während und nach dem Auftauen und
- 20 während der Durchführung des Untersuchungsverfahrens z.B. während einer etwaigen Inkubation zugesetzt werden.

- Beispiele geeigneter Gerinnungshemmer sind Natriumzitrat z.B. einer Endkonzentration von 0,38 Gew.-% oder Heparin wie Natriumheparin,
- 25 Heparinfraktionen und dergleichen.

- Die erfindungsgemäße Verwendung von tiefgefrorenes Blut enthaltenden Zubereitungen einschließlich tiefgefrorenem Blut oder tiefgefrorenen Leukozyten wird mit besonderem Vorteil zur Untersuchung von Materialien,
- 30 wie den eingangs schon erörterten Gegenständen, Stoffen und Mitteln auf immunstimulatorische oder immunmodulatorische Wirkungen bzw. zur qualitativen und/oder quantitativen Bestimmung immunrelevanter Wirkungen verwendet, unter Ermittlung, Bestimmung bzw. Auswertung der Blut-Antwort bei Kontakt dieser Prüfmateriellen mit dem aufgetauten,

- 1 tiefgefrorenen Blut bzw. Blutzubereitung.

- Über immunstimulatorische z.B. pyrogene Wirkungen hinaus können Materialien die nachfolgende Aktivierung des Immunsystems modulieren,
- 5 was bei Immuntherapeutika erwünscht aber auch häufig eine unerwünschte toxische Wirkung ist. Eine solche Wirkung soll bei der immunpharmakologischen Wirkstofffindung gezielt gesucht bei vielen anderen Stoffen jedoch ausgeschlossen werden. Von therapeutischem Interesse sind einerseits Immunstimulanten zur Therapie absoluter oder relativer
- 10 Immunschwäche und andererseits Immunsuppressiva und Entzündungshemmer, einschließlich der Antiphlogistika, Antirheumatika, Antiallergika. Immuntoxikologische Wirkungen von Materialien z.B. von Substanzen kommen erst in den letzten Jahren zunehmend in das öffentliche Bewußtsein. Für die immunpharmakologische wie immuntoxikologische Stoff-
- 15 prüfung gibt es bisher keine standardisierten Testsysteme. Stimuliertes Vollblut wird jedoch zunehmend wissenschaftlich zur Charakterisierung der pharmakologischen Eigenschaften von Wirkstoffen eingesetzt [Hartung et al. Blood 85 (1995) 2482-2489].
- 20 Gerade auch bei der Untersuchung auf immunrelevante Wirkungen wie bei der Bestimmung von Pyrogenen, Immunmodulatoren und Immuntoxinen ist das zentrale Problem der Anwendungen von Blut und seiner Faktorfreisetzung die Standardisierung des verwendeten Bluts.
- 25 Auch hier können die vorgenannten Blutzubereitungen wie Vollblut, gegebenenfalls verdünnt, zum Beispiel mit Zellkulturmedien, Puffern oder klinischer Kochsalzlösung, verwendet werden. Hier muß besonders häufig die Durchführung der Untersuchung innerhalb weniger Stunden beginnen, so daß eine vorausgehende Prüfung auf Eignung des verwendeten
- 30 Blutmaterials deshalb im allgemeinen nicht möglich ist. In besonderem Maße stellt sich die vorgenannte Aufgabe demgemäß bei der Untersuchung von Materialien auf immunrelevante Wirkungen wie auf pyrogene, immunmodulatorische oder immuntoxische Wirkungen und soll die vorherige Prüfung des Bluts sowie die wiederholte Prüfung eines Materials an

- 1 verschiedenen Orten und zu verschiedenen Zeiten mit demselben Test-
Blut ermöglicht werden. Dies wird durch die erfindungsgemäße Verwen-
dung zuverlässig bewirkt.
- 5 Der besondere Vorteil der Erfindung besteht bei der Ermittlung immunre-
levanter Wirkungen und Daten in der Verwendung eines biologischen Sy-
stemes, das relevante Aussagen für die Exposition des Menschen liefert.
Als Meßparameter dienen Zytokine wie die endogenen Pyrogene Interleu-
kin-1 β , Interleukin-6 und Tumor-Nekrose-Faktor, Eicosanoide wie das
10 endogene Pyrogen Prostaglandin E₂, oder andere von Leukozyten freige-
setzte Stoffe wie Degranulationsprodukte, lösliche Rezeptoren, Proteine
oder niedermolekulare Substanzen (vgl. auch EP 0 741 294 A2, worauf Be-
zug genommen wird). Bemerkenswert ist, daß auch in vorliegendem Ver-
wendungsverfahren nicht nur die Gerinnungshemmer Citrat und Heparin
15 keinen das Ergebnis verfälschenden Einfluß haben, sondern auch die Tief-
frierkonservierung einschließlich der genannten Kryopräservierungsmit-
tel zu einem Blut führt, das nach dem Auftauen keinerlei nachteilige Aus-
wirkungen auf das Untersuchungsergebnis zeigt.
- 20 Die Erfindung weist eine ganze Reihe von weiteren Vorteilen auf. Nach dem
Auftauen des tiefgefrorenen Bluts werden wieder körpereigene Reaktionen
von nativen Immunzellen und natürlichen Bedingungen und Mischungs-
verhältnissen erfaßt.
- 25 Es kann dank der Tieffrier-Konservierung wiederholt dasselbe Blut zu ver-
schiedenen Zeiten und an verschiedenen Orten verwendet werden. Durch
entsprechende Vortestungen können abnorme Blutreaktionen erkannt
und das entsprechende Material ausgesondert werden. Es können vorab
unter standardisierten Bedingungen Normwerte für die jeweilige Blut-
30 charge ermittelt werden. Es ermöglicht die Testdurchführung auch ohne
unmittelbare Möglichkeiten zur Blutabnahme. Es können nicht nur z.B.
direkte Immunaktivatoren sondern auch Immunmodulatoren/Immunto-
xine an ihrer Modulation der Wirkung eines Standardstimulus wie Endo-
toxin (Lipopolysaccharid Gram-negativer Bakterien) ermittelt werden. Die

- 1 Erfindung eignet sich auch zur Prüfung von pharmakologischen Thera-
pien oder Expositionen ex vivo, indem Blut entsprechender Patienten, Pro-
banden oder Versuchstiere nach Verabreichung gewonnen und entspre-
chend tiefgefroren z.B. kryopräserviert wird und erst später z.B. die Reak-
5 tionsfähigkeit gegen einen Standardstimulus getestet wird.

- Gegenstand der Erfindung ist auch eine ein Kollektiv enthaltende Zuberei-
tung mit einem Gehalt an oder bestehend aus tiefgefrorenem Blut in Form
standardisierter Einheitsdosen für biologische Untersuchungsverfahren
10 mit Bestimmung der Blut-Antwort auf Kontakt mit Prüfmateriäl.

- Als Blut wird bevorzugt frisches Vollblut von gesunden tierischen oder
menschlichen Spendern, das gegebenenfalls nach Zusatz von Kryopräser-
vierungsmitteln, Verdünnungs- und/oder gerinnungshemmenden Mit-
15 teln, wie sie in beispielhafter Weise zuvor beschrieben sind, portioniert
und tiefgefroren wird. Die Einheitsdosis enthält meist zwischen 50 bis 500
Mikroliter, bevorzugt 100 Mikroliter Vollblut, ohne darauf beschränkt zu
sein. Zur Durchführung des Untersuchungsverfahrens wird das tiefgefro-
rene Blut einer Einheitsdosis aufgetaut, z.B. bis auf ein gewünschtes Vo-
20 lumen, beispielsweise 1 Milliliter, mit Verdünnungsmitteln z.B. vorge-
nannter Art aufgefüllt, mit dem Prüfmateriäl in Kontakt gebracht und die
Blut-Antwort in üblicher Weise bestimmt und ausgewertet. Das üblicher-
weise von einem gesunden menschlichen Spender in einer Sitzung ab-
nehmbare Vollblutvolumen erlaubt bei einer Einzeldosis von z.B. 100 Mi-
25 kroliter Blut die Herstellung von mehreren tausend solcher Einheitsdo-
sen. Die Einheitsdosen können zu Kollektiven von beispielsweise 5, 10
oder mehr Einheitsdosen zusammengefaßt und, gegebenenfalls versehen
mit für das Untersuchungsverfahren verwertbaren Daten, unter Aufrech-
terhaltung der Tiefkühlung in den Verkehr gebracht werden. Die Kollekti-
30 ve können für besondere Verwendungszwecke neben Einheiten mit Ein-
heitsdosen auch Einheiten mit einem mehrfachen der Einheitsdosis ent-
halten.

Die jeweilige Einheitsdosis kann im übrigen die gleichen Bestandteile ent-

- 1 halten und die gleiche Zusammensetzung aufweisen sowie in gleicher Weise hergestellt sein und verwendet werden wie die zuvor beschriebenen tiefgefrorenes Blut enthaltenden Zubereitungen.

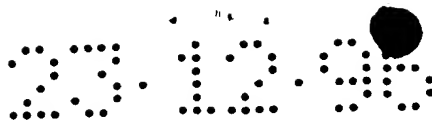
5 Beispiel

- Zitratblut gesunder Spender wurde unmittelbar nach Abnahme mit 10 % Dimethylsulfoxid (Merck, Darmstadt) versetzt, zu jeweils 100 µl in 2-ml Reaktionsgefäße aliquotiert (Eppendorf, Hamburg) und in kommerziellen Einfriersystemen (Mr. Freezy, Nalgene) in einem -70°C-Tiefkühlschrank überführt. Das Auftauen erfolgt in einem Thermoschüttler (Eppendorf, Hamburg) bei 37°C. Unmittelbar nach dem Auftauen werden jeweils 900 µl 37°C-warmes RPMI 1640 (Gibco, Eggenstein) zugesetzt. Anschließend werden die Prüfsubstanzen zum Beispiel Verdünnungen eines Pyrogens, hier Lipopolysaccharid von Salmonella abortus equi (Sigma, Deisenhofen) zugesetzt. Nach einer vierstündigen Inkubation bei 37°C zum Beispiel im Brutschrank (Heraeus, Fellbach) mit 5 % Kohlendioxid, werden die Inkubationen geschüttelt, abzentrifugiert. Im zellfreien Überstand werden ggf. nach Einfrieren endogene Pyrogene, hier IL-1β bestimmt. Abb. 1 zeigt IL-1β-Bildung im kryopräservierten Blut von vier gesunden Spendern in Abhängigkeit der zugesetzten Pyrogenmenge. IL-1β wurde mit einem ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) aus Antikörpern der Firma Pharmingen (Hamburg) gemessen. Der Versuch zeigt die Freisetzung endogener Pyrogene bei Anwesenheit geringster Pyrogenmengen.

25

Die Figuren 2 und 3 zeigen die Freisetzung von IL-1 bei mit LPS stimuliertem, eingefrorenem Vollblut in Abhängigkeit von der jeweils verabfolgten Menge an Azathioprin bzw. Dexamethason.

30



14

Patentansprüche

- 1 1. Verwendung von menschlichem oder tierischem tiefgefrorenem Blut oder einer tiefgefrorenes Blut enthaltenden Zubereitung für biologische Untersuchungsverfahren mit Bestimmung der Blut-Antwort auf Kontakt mit Prüfmaterial.
- 5 2. Verwendung gemäß Patentanspruch 1, wobei als Blut eine tiefgefrorene aus Blut isolierte Leukozyten enthaltende Zubereitung verwendet wird.
- 10 3. Verwendung gemäß Patentanspruch 1 oder 2, worin die Zubereitung Kryopräservierungsmittel enthält.
4. Verwendung gemäß einem der vorhergehenden Patentansprüche, worin die Zubereitung Gerinnungshemmer enthält.
- 15 5. Verwendung gemäß einem der vorhergehenden Patentansprüche zur Ermittlung immunrelevanter Daten.
6. Kollektiv enthaltend Zubereitungen mit einem Gehalt an oder bestehend aus tiefgefrorenem Blut in Form von standardisierten Blut-Einheitsdosen für biologische Untersuchungsverfahren mit Bestimmung der Blut-Antwort auf Kontakt mit Prüfmaterial.
- 20 7. Kollektiv gemäß Patentanspruch 6 enthaltend neben Einheiten jeweils mit standardisierter Einheitsdosis auch Einheiten jeweils mit einem mehrfachen der Einheitsdosis.
- 25 8. Kollektiv gemäß Patentanspruch 6 oder 7, worin die Zubereitungen Kryokonservierungsmittel, Gerinnungshemmer und/oder Verdünnungsmittel enthalten.
- 30 9. Kollektiv gemäß einem der vorhergehenden Patentansprüche zur Ermittlung immunrelevanter Daten.

23.10.98

15

1/2

Fig. 1

IL-1 β Freisetzung von mit LPS stimuliertem eingefrorenem 10% Vollblut

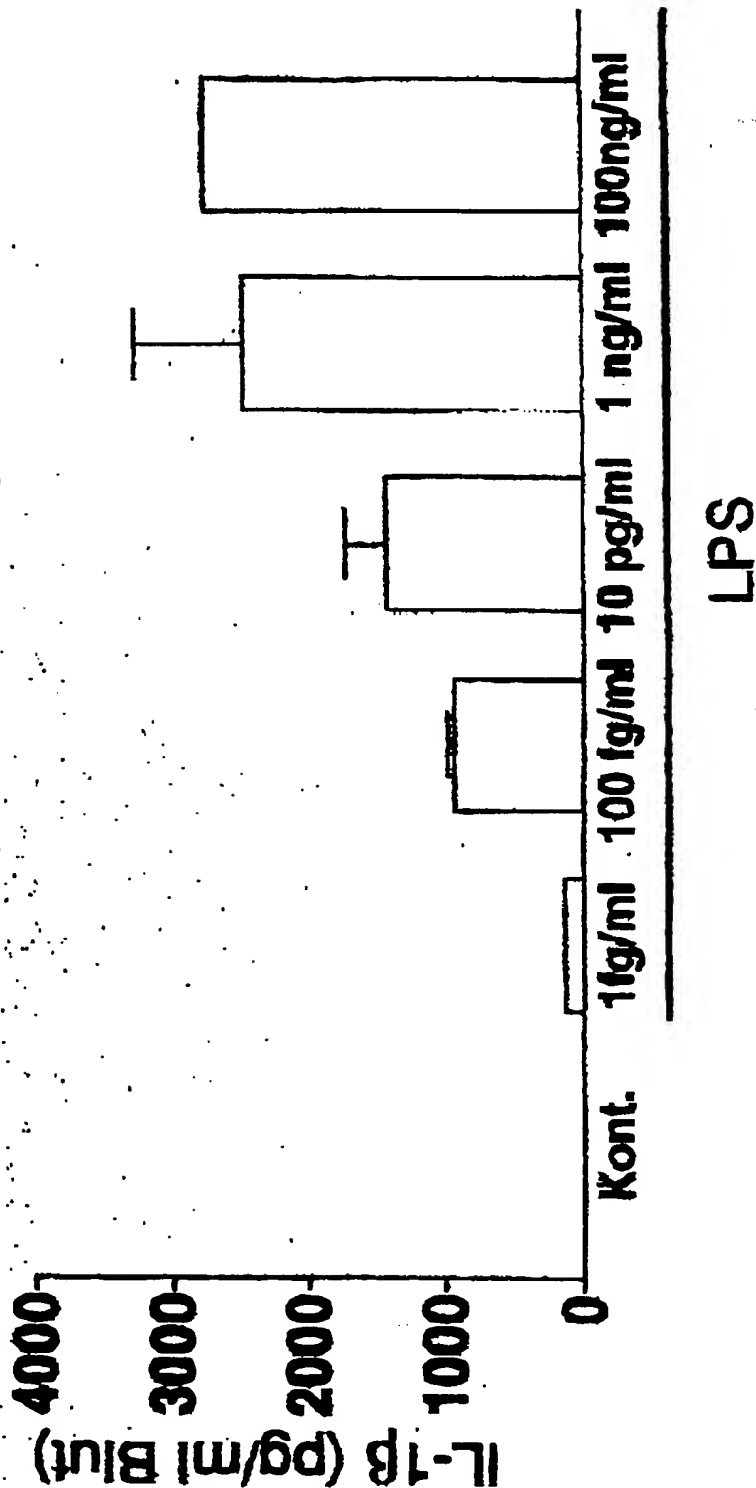
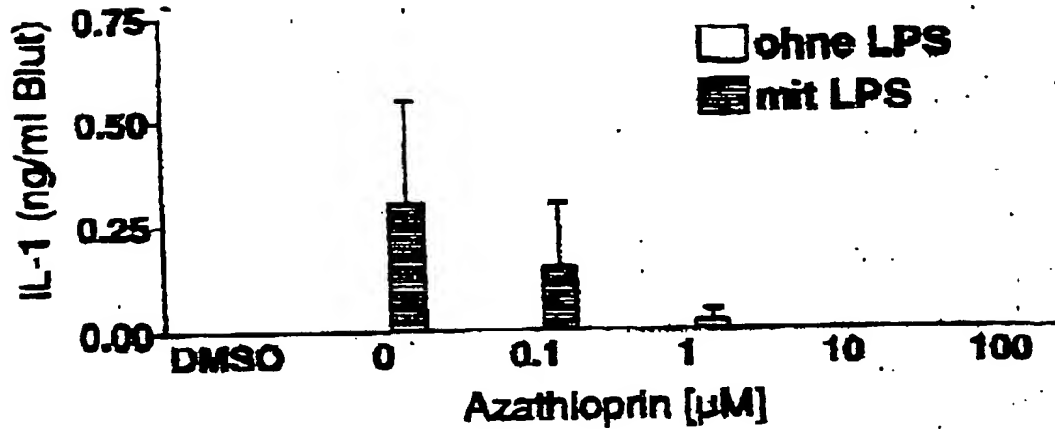


Fig. 2

IL-1 Freisetzung von mit LPS
stimuliertem eingefrorenem 10% huVB
(19.11.98, 9.1% DMSO, n=4/1, RMPI 1640)

Fig. 3

IL-1 Freisetzung von mit LPS
stimuliertem eingefrorenem 10% huVB
(19.11.98, 9.1% DMSO, n=4/1, RMPI 1640)

